

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/574 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680048492.5

[43] 公开日 2009年1月14日

[11] 公开号 CN 101346628A

[22] 申请日 2006.12.19

[21] 申请号 200680048492.5

[30] 优先权

[32] 2005.12.22 [33] EP [31] 05028126.0

[86] 国际申请 PCT/EP2006/012218 2006.12.19

[87] 国际公布 WO2007/071367 英 2007.6.28

[85] 进入国家阶段日期 2008.6.20

[71] 申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 J·卡尔 V·格鲁纳特

J·P·特坎 P·斯特格米勒

M·塔克 N·威尔德

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘健 刘玥

权利要求书1页 说明书23页

[54] 发明名称

包含骨桥蛋白和癌胚抗原的标记物组合在结肠直肠癌的评估中的用途

[57] 摘要

本发明涉及帮助评估结肠直肠癌(=CRC)的方法。公开了包含骨桥蛋白和癌胚抗原的标记物组合在结肠直肠癌的评估中的用途。此外,它特别涉及通过测量样品中至少标记物骨桥蛋白和癌胚抗原来来自个体的液体样品评估结肠直肠癌的方法。包含骨桥蛋白和癌胚抗原的标记物组合可以,例如,用于结肠直肠癌的早期检测或用于监督经历了治疗例如手术的患者。

1. 一种体外评估结肠直肠癌的方法，其中所述方法包括步骤：
 - a) 测量样品中骨桥蛋白的浓度，
 - b) 测量样品中癌胚抗原的浓度，和
 - c) 任选的一种或多种其他结肠直肠癌标记物的浓度，以及
 - d) 组合在步骤 (a)、(b) 中测定的浓度和任选的在步骤 (c) 中测定的浓度，用于评估结肠直肠癌。
2. 根据权利要求 1 的方法，其中所述一种或多种其他标记物选自 NSE、ASC、NNMT、CA 19-9、CA 72-4、MASP、CYFRA 21-1 和 FERR。
3. 根据权利要求 2 的方法，其中所述一种或多种其他标记物是 NSE。
4. 根据权利要求 2 的方法，其中所述一种或多种其他标记物是 NNMT。
5. 标记物组合骨桥蛋白和癌胚抗原在结肠直肠癌的评估中的用途。
6. 包含骨桥蛋白和癌胚抗原以及一种或多种其他结肠直肠癌标记物的标记物组在结肠直肠癌的评估中的用途。
7. 根据权利要求 6 的标记物组的用途，其中所述一种或多种其他标记物选自 NSE、ASC、NNMT、CA 19-9、CA 72-4、MASP、CYFRA 21-1 和 FERR。
8. 根据权利要求 7 的至少包含骨桥蛋白、癌胚抗原和 NSE 的标记物组的用途。
9. 根据权利要求 7 的至少包含骨桥蛋白、癌胚抗原和 NNMT 的标记物组的用途。
10. 一种用于进行根据权利要求 1 的方法的试剂盒，其包含特异性地测量骨桥蛋白和癌胚抗原所需的试剂。

包含骨桥蛋白和癌胚抗原的标记物组合 在结肠直肠癌的评估中的用途

本发明涉及帮助评估结肠直肠癌 (=CRC) 的方法。公开了包含骨桥蛋白和癌胚抗原的标记物组合在结肠直肠癌的评估中的用途。此外，它特别涉及通过测量样品中至少标记物骨桥蛋白和癌胚抗原来从来自个体的液体样品评估结肠直肠癌的方法。包含骨桥蛋白和癌胚抗原的标记物组合可以，例如，用于结肠直肠癌的早期检测或用于监督经历了治疗例如手术的患者。

尽管在检测和治疗方面有进展，癌症仍然是主要的公共卫生挑战。在各种类型的癌症中，结肠直肠癌 (=CRC) 是西方世界最常见的癌症之一。

结肠直肠癌最经常地从腺瘤 (息肉) 发展为恶性癌。CRC 的不同阶段曾经根据 Dukes' 阶段 A 到 D 来分类。

癌症的分期是就程度、发展和严重度而言的疾病的分类。它将癌症患者分组，从而关于预后和治疗选择可以进行普遍化。

当今，TNM 系统是癌症的解剖学范围上最广泛使用的分类法。它代表了国际公认的、统一的分期系统。其中有三种基本变量：T (原发肿瘤的程度)、N (区域性淋巴结的状态) 和 M (远距离转移的存在或不存在)。由 UICC (国际癌症防治联合会) 公开了 TNM 指标 (Sobin, L.H. and Fleming, I.D., Cancer 80 (1997) 1803-1804)。

特别重要的是，CRC 的早期诊断转变为好得多的预后。大多数结肠直肠癌的恶性肿瘤看起来来自于良性肿瘤，即，来自腺瘤。因而，最好的预后是在腺瘤阶段诊断出的那些患者。在早至阶段 T_{is}, N₀, M₀ 或 T₁₋₃; N₀; M₀ 诊断的患者如果适当地治疗，在诊断后有超过 90% 的 5 年存活机会，相比较的，当已经存在远距离转移时诊断的仅 10% 的 5 年存活率。

在本发明的意义上，CRC 的早期诊断是指处于前恶性状态 (腺瘤) 或处于完全没有转移 (既没有近端也没有远端) 的肿瘤阶段的诊断结论，即，存在腺瘤、T_{is}, N₀, M₀ 或 T₁₋₄; N₀; M₀。T_{is} 表示原位癌。

进一步优选的，当完全没有生长通过肠壁因而既没有腹膜脏层穿

孔也没有其他器官或结构被侵入时诊断 CRC，即，该诊断结论在阶段 Tis、N0、M0 或 T1-3; N0; M0 (= T_{is}-3; N0; M0) 做出。

癌症被检测/诊断越早，总体存活率越好。这对于 CRC 是特别符合的。在肿瘤的发展阶段中的预后是不好的。在诊断后五年内超过三分之一的患者将死于进行性疾病，相应于约 40% 的五年存活率。当前的治疗仅仅治愈一小部分患者，对于在疾病的早期阶段诊断的那些患者明显具有最好的效果。

对于作为公众健康难题的 CRC，必须的是开发对于结肠直肠癌的更有效的筛选和预防措施。

当前对于结肠直肠癌可用的最早期的检测过程涉及使用粪便潜隐血或内窥镜操作。然而，在检测出粪便血液之前一般必须有显著的肿瘤大小。基于愈创木脂的粪便潜隐血测试的敏感性是 ~26%，其意味着具有恶性病变的 74% 的患者将仍未被测出。(Ahlquist, D.A., Gastroenterol. Clin. North Am. 26 (1997) 41-55)。前癌性和癌性病变的可视化是早期检测的最好方法，但是结肠镜检查是侵入性的，具有显著的费用、风险和并发症。(Silvis, S.E., 等人, JAMA 235 (1976) 928-930; Geenen, J.E., 等人, Am. J. Dig. Dis. 20 (1975) 231-235; Anderson, W.F., 等人, J. Natl. Cancer Institute 94 (2002) 1126-1133)。

为了具有临床实用性，作为单一标记物的新的诊断标记物应当至少与本领域已知的最好的单一标记物一样好。或者，新的标记物应当产生诊断敏感性和/或特异性方面的进展，如果分别地单独使用或与一种或多种其他标记物组合使用。测试的诊断敏感性和/或特异性通过它的接受者操作特征来最好地评定，其将在下文详细描述。

结肠直肠癌中生物化学标记物的临床实用性近来已经由关于肿瘤标记物的欧洲集团(EGTM)(Duffy, M.J., 等人, Eur. J. Cancer 39(2003) 718-727) 综述了。

目前，基于肿瘤相关糖蛋白癌胚抗原 (CEA) 的检测的主要诊断性血液测试可以用于帮助 CRC 领域的诊断。CEA 在患有结肠直肠、胃和胰腺癌以及在大部分乳腺、肺以及头颈癌症的患者获得的 95% 的组织样品中提高 (Goldenberg, D.M., 等人, J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 57 (1976) 11-22)。提高的 CEA 水平还在患有非恶性疾病的患者中报道，具有新近检测的结肠直肠癌的许多患者具有血清中的正常 CEA 水

平，特别是在疾病的早期阶段（Carriquiry, L.A., 和 Pineyro, A., *Dis. Colon Rectum* 42 (1999) 921-929; Herrera, M.A., 等人, *Ann. Surg.* 183 (1976) 5-9; Wanebo, H.J., 等人, *N. Engl. J. Med.* 299 (1978) 448-451; Wanebo, H.J., 等人, 上文)。在检测复发中从血清或血浆测量的 CEA 的实用性据报道是争议性的, 尚未被广泛地应用 (Martell, R.E., 等人, *Int. J. Biol. Markers* 13 (1998) 145-149; Moertel, C.G., 等人, *JAMA* 270 (1993) 943-947)。

根据可获得的数据, 血清 CEA 测定对于允许它在无症状群体中作为结肠直肠癌的筛选测试既没有敏感性也没有特异性 (Reynoso, G., 等人, *JAMA* 220 (1972) 361-365; Sturgeon, C., *Clinical Chemistry* 48 (2002) 1151-1159)。

全血、血清或血浆是在临床常规实验中最广泛使用的样品来源。将帮助可靠的癌症检测或提供早期预后信息的早期 CRC 肿瘤标记物的鉴定可以产生将很大地帮助这种疾病的诊断和管理的诊断性分析。因而, 存在着急迫的临床需求来改善 CRC 的体外评估。改善 CRC 的早期诊断是特别重要的, 因为与在疾病的发展期诊断的那些患者相比, 早期诊断的患者存活率机会要高得多。

本发明的任务是研究是否可以鉴定出可以在评估 CRC 中使用的生物化学标记物。

令人惊讶地, 发现的是, 包含骨桥蛋白和癌胚抗原的标记物组合可以至少部分地克服本领域现有技术已知的难题。

发明概述

本发明涉及体外评估结肠直肠癌的方法, 包括测量样品中骨桥蛋白的浓度、测量样品中癌胚抗原的浓度、和任选地测量一种或多种其他结肠直肠癌标记物, 并且组合分别对骨桥蛋白、癌胚抗原和任选的一种或多种其他结肠直肠癌标记物所测定的浓度用于评估结肠直肠癌的步骤。

还公开的是标记物组合骨桥蛋白和癌胚抗原在结肠直肠癌的评估中的用途, 以及包含骨桥蛋白、癌胚抗原和一种或多种其他结肠直肠癌标记物的标记物组 (panel) 在结肠直肠癌的评估中的用途。

本发明进一步涉及用于根据本发明进行评估 CRC 的方法的试剂

盒，其包含特异性地测量骨桥蛋白和癌胚抗原所需的试剂。

发明的详细说明:

在优选的实施方式中，本发明涉及体外评估结肠直肠癌的方法，包括步骤：a) 测量样品中骨桥蛋白的浓度，b) 测量样品中癌胚抗原的浓度，和c) 任选地测量一种或多种其他结肠直肠癌标记物，以及d) 组合在步骤(a)、(b)中测定的浓度，和任选地在步骤(c)中测定的浓度用于评估结肠直肠癌。

骨桥蛋白(OPN):

OPN 在正常血浆、尿液、奶和胆汁中发现(US 6,414,219; US 5,695,761; Denhardt, D.T. and Guo, X., FASEB J. 7(1993) 1475-1482; Oldberg, A., 等人, PNAS 83(1986) 8819-8823; Oldberg, A., 等人, J. Biol. Chem. 263(1988) 19433-19436; Giachelli, C.M., 等人, Trends Cardiovasc. Med. 5(1995) 88-95)。已经分离和测序了人类 OPN 蛋白质和 cDNA(Kiefer M.C., 等人, Nucl. Acids Res. 17(1989) 3306)。

OPN 功能在于细胞粘附、趋化性、巨噬细胞指导的白细胞介素-10(IL-10)抑制、逆境依赖性血管生成、细胞凋亡的防止、通过调节细胞-基质相互作用的锚依赖性的肿瘤细胞生长，以及通过与整联蛋白和 CD44 受体结合的细胞信号转导。虽然 OPN 的组成型表达在几种细胞类型中存在，已经在改型过程例如炎症、缺血-重灌注、骨吸收和肿瘤发展中的 T 淋巴细胞、表皮细胞、骨细胞、巨噬细胞和肿瘤细胞中检测到诱导的表达(由 Wai, P.Y. & Kuo P.C. J. Surg. Res. 121(2004) 228-241 综述)。

已知 OPN 与许多整联蛋白受体相互作用。已经报道了在许多人类癌症中检测到提高的 OPN 表达，已经鉴定了它的同源受体(av-b3、av-b5 和 av-b1 整联蛋白和 CD44)。Irby, R.B., 等人, Clin. Exp. Metastasis 21(2004) 515-523 的体外研究表明，内源 OPN 表达(经由稳定的转染)以及外源 OPN(添加到培养基)增强了体外的人类结肠癌细胞的运动性和侵入能力。OPN 看起来通过与 CD44 相互作用调节运动性。OPN 表达还降低细胞间(同型的)粘附，其被认为是转移性癌细胞的特征。用 OPN 稳定转染四种不良致瘤性的人类结肠癌细胞系也引起了体内增

加的肿瘤发生，具有提高的增殖和提高的 CD31 阳性微血管计数，与 OPN 表达的程度一致。

Mor, G., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 7677-7682 报道了根据 OPN 和三种其他被分析物的同时定量的上皮卵巢癌的早期诊断的血液（血清）测试。

在优选的实施方式中，本发明涉及通过生物化学标记物体外评估 CRC 的方法，包括测量样品中骨桥蛋白的浓度并在 CRC 的评估中使用测定的浓度。

癌胚抗原（CEA）:

CEA（癌胚抗原）是具有大约 45-60% 可变碳水化合物成分的单体糖蛋白（分子量大约 180,000 道尔顿）(Gold, P. and Freedman, S.O., J. Exp Med 121 (1965) 439-462)。

CEA，如 AFP，属于胎儿癌性抗原的组，其在胚胎和胎儿时期期间产生。CEA 基因家族由属于两个亚群的约 17 种活性基因组成。第一组含有 CEA 和非特异性交叉反应抗原（NCA）；第二组含有妊娠特异性糖蛋白（PSG）。

CEA 主要在胎儿胃肠道和胎儿血清中存在。它还以微小数量在健康成年人的肠、胰腺、和肝组织中存在。CEA 的形成在出生之后被抑制，从而在健康成年人中血清 CEA 值几乎不可测量。

高的 CEA 浓度经常在结肠直肠癌的情况下发现。（Fateh-Modhadam, A. 等人 (eds.), Tumormarker und ihr sinnvoller Einsatz, Juergen Hartmann Verlag GmbH, Marloffstein-Rathsberg (1993), ISBN-3-926725-07-9)。轻微到中度的 CEA 升高（很少 > 10 ng/mL）在 20-50% 的肠、胰腺、肝脏和肺部的良性疾病中发生（例如，肝硬化、慢性肝炎、胰腺炎、溃疡性结肠炎、Crohn's 病、肺气肿）（Fateh-Moghadam, A., 等人, 上文）。吸烟也可以提高 CEA 值。

CEA 测定的主要适应症是患有结肠直肠癌的患者的治疗管理和跟踪。

CEA 测定不被建议用于一般人群的癌症筛选。正常范围内的 CEA 浓度不能排除恶性疾病的可能存在。

在由 Roche Diagnostics 生产的分析中抗体与 CEA（如几乎所有的

CEA 检测方法一样) 并与阿片抗原 (NCA2) 反应。与 NCA1 的交叉反应性是 0.7% (Hammarstrom, S., 等人, Cancer Res. 49 (1989) 4852-4858; 和 Borner, O.P., Tumor Biol. 12 (1991) 9-15)。

已经根据厂家的说明书使用 Roche 产品号码 11731629 在 Elecsys® 分析仪上测量的 CEA。

如在此使用的, 在本节中, 以下每一个术语具有与之相关的含义。

在此使用的冠词“一个”和“一种”是指冠词的一个或超过一个(即, 至少一个)语法上的目标。举例来说, “一标记物”是指一个标记物或超过一个标记物。

在此使用的术语“标记物”或“生物化学标记物”是指用作目标用于分析患者测试样品的分子。这些分子目标的实例是样品中存在的蛋白或多肽本身以及抗体。用作本发明中的标记物的蛋白或多肽预期包括所述蛋白的任何变体以及所述蛋白或所述变体的片段, 特别是免疫学可检测的片段。本领域的技术人员将认识到, 例如, 在炎症期间由细胞释放或存在于变得损坏的细胞外基质中的蛋白质可以被降解或裂解成这样的片段。某些标记物以无活性的形式合成, 其随后可以通过蛋白水解作用活化。熟练技术人员将理解, 蛋白或其片段也可以作为复合物的部分存在。这种复合物也可以用作本发明意义上的标记物。标记物多肽的变体由相同的基因编码, 但在它们的 PI 或 MW, 或两者上(例如, 作为选择性 mRNA 或前 mRNA 加工的结果, 例如选择性剪接或限制的蛋白水解)不同, 此外地或可选择地, 可以来自不同的翻译后修饰(例如, 糖基化、酰化和/或磷酸化)。

术语“评估结肠直肠癌”被用于表明, 例如, 根据本发明的方法将(单独地或与其他方法或参数如 UICC(参见上文)阐述的指标一起)帮助医师确定或确认 CRC 的不存在或存在, 或在预后、治疗效力的监视(例如, 在手术、化疗或放疗之后)以及复发的检测(治疗后患者的跟踪)方面帮助医师。

在此使用的术语“样品”是指为了体外评估的目的获得的生物样品。在本发明的方法中, 样品或患者样品优选地可以包含任何体液。优选的测试样品包括血液、血清、血浆、尿液、唾液和滑液。优选的样品是全血、血清、血浆或滑液, 血浆或血清是最优选的。

熟练技术人员将理解, 任何测量和相应的评定是在体外进行的。

患者样品后来被丢弃。患者样品单独地用于本发明的体外诊断方法，患者样品的材料不转移回患者体内。一般地，所述样品是液体样品，例如全血、血清或血浆。

诊断的理想情况将是一种情况，其中单独的事件或过程将引起相应的疾病，例如在传染性疾病中。在所有其他情况下，正确的诊断结论将是非常困难的，特别是当疾病的病因不被完全理解时，如 CRC 的情况。熟练的技术人员将理解，没有生物化学标记物，例如在 CRC 的情况中，是具有 100%特异性同时具有 100%敏感性的诊断性的。然而生物化学标记物，例如，被用于以某些可能性或预测价值来评估疾病的存在或不存在。因而在常规临床诊断中，一般地各种临床症状和生物标志物在原发疾病的诊断、治疗和管理中一起考虑。

生物化学标记物可以分别地测定，或在本发明的优选的实施方式中，它们可以使用基于芯片或珠子的阵列技术同时地测定。然后为每个标记物使用单独的截止值(cut-off)独立地打断生物标记物的浓度，或组合它们用于解释。优选的，对 CEA 和骨桥蛋白测量的值使用数学的或统计学的函数组合。

在本发明中公开的包含骨桥蛋白和 CEA 的标记物组合可以改善 CRC 的评估。包含骨桥蛋白和 CEA 的标记物组合在一个或多个以下方面可能是特别有用的：筛选；诊断帮助；预后；治疗和跟踪的监视。

筛选：

CRC 是发达国家男性和女性的第二常见的恶性肿瘤。由于它的高发病率、它的长无症状阶段和前恶性病变的存在，CRC 满足了筛选的许多指标。明显地，与 FOB 测试或内窥镜检查相比，具有可接受的敏感性和特异性的血清肿瘤标记物将更适合于筛选。

如在实施例小节中给出的数据展现了单独的标记物 OPN 和单独的标记物 CEA 都不足以容许例如 CRC 的风险群体的一般性筛选。对于这两种标记物，在筛选所需的特异性水平下，敏感性不够高。然而，本发明中确定的数据表明，标记物 OPN 和 CEA 的组合将形成适合于筛选目的的标记物组的整体部分。因而本发明涉及使用 OPN 和 CEA 作为 CRC 标记物组的核心用于 CRC 筛选目的。当前的数据进一步表明，这两种标记物与一种或多种其他标记物的某些组合将在 CRC 的筛

选中是有益的。因而，本发明还涉及使用包含 OPN、CEA 和 NSE 的标记物组，或包含 OPN、CEA 和 NNMT 的标记物组，例如，用于筛选 CRC 的目的。

诊断帮助：

外科手术前的 CEA 值具有有限的鉴定价值。尽管如此，肿瘤标记物欧洲委员会 (ECTM) 建议，CEA 应当在手术前测量以建立基准值和用于评估预后。根据本发明的标记物组合预计优于单独的标记物 CEA。因而预期的和代表本发明的优选的实施方式的是，包含 OPN 和 CEA 的标记物组合被用于诊断帮助。一旦在手术之前确定了基准值，标记物组合可以有特别好的诊断帮助。

因而本发明还涉及使用标记物组合 OPN 和 CEA 用于在 CRC 手术之前确定基准值。

预后：

在 CRC 患者中用于确定预后的金标准是 Dukes'、TNM 或其他分阶段系统所定义的疾病的扩展。如果标记物如 CEA 将用于预测结局，它必需：提供比现有分阶段系统提供的更强壮的预后信息，提供独立于现有系统的信息，或提供由现有制备定义的特定亚群，例如在 Dukes' B 或淋巴结阴性患者中的预后数据。

近来，美国癌症联合委员会 (AJCC) 共识会议建议，CEA 应当被加入用于结肠直肠癌的 TNM 分阶段系统。CEA 水平应当如下指定：CX，不能评估 CEA；CO，CEA 没有提高 ($<5 \mu\text{g/l}$)；或 CEA1，CEA 提高 ($>5 \mu\text{g/l}$) (Compton, C., 等人, Cancer 88 (2000) 1739-1757)。

在优选的实施方式中，标记物组合 CEA 和 OPN 被用于预测患有 CRC 的患者的疾病进程。在进一步优选的实施方式中，如 AJCC 对于 CEA 所建议的，OPN 和 CEA 的外科手术前水平与用于 CRC 和/或 TNM 分阶段系统的一种或多种其他标记物组合，并用于患有 CRC 的患者的疾病结局的预测。

化疗的监视：

许多报导已经描述了在监视患有高级 CRC 的患者的治疗中使用

CEA (for review, see Duffy, M.J., Clin. Chem. 47 (2001) 625-630; Fletcher, R.H., Ann. Int. Med. 104 (1986) 66-73; Anonymous, J. Clin. Oncol. 14 (1996) 2843-2877)。大多数这些研究是回顾性的、非随机的, 并含有少量的患者。这些研究表明: a) 与 CEA 水平未能降低的那些患者相比, 具有 CEA 水平的降低的患者当接受化学治疗时一般具有更好的结局, 和 (b) 对于几乎所有的患者, CEA 水平的提高与疾病进展相关。

由于在实施例小节中显示的数据, 必需预计的是, 如果用于化疗的监视, 包含 OPN 和 CEA 的标记物组合将优于单独的 CEA。因而本发明还涉及在化疗的 CRC 患者的监视中使用包含 OPN 和 CEA 的标记物组合。

跟踪:

经历了目的在于治愈的外科切除术的大约 50% 的患者, 以后发展出复发性的或转移性的疾病 (Berman, J.M., 等人, Lancet 355 (2000) 395-399)。大多数这些复发发生在诊断的前 2-3 年内, 通常限于肝脏、肺或本地区域。因为复发性/转移性疾病总是致死的, 相当多的研究已经集中于它在早期并因而是潜在可治疗阶段时的鉴定。因此, 这些患者中的许多经历了手术后的监视计划, 其经常包括 CEA 的常规监视。

已经显示了 CEA 的连续监视以大约 80% 的敏感性和大约 70% 的特异性检测复发性/转移性疾病, 并提供了 5 个月的平均提前时间 (综述参见 Duffy, M.J., 等人, 上文, 和 Fletcher, R.H., 上文)。此外, CEA 是无症状患者中复发的最常见指标 (Pietra, N., 等人, Dis. Colon Rectum 41 (1998) 1127-1133; 和 Graham, R.A., 等人, Ann. Surg. 228 (1998) 59-63) 并且比用于潜在可治疗的复发疾病检测的放射学更为经济。关于再发生/转移的位点, CEA 对于肝脏转移的检测是最敏感的 (几乎 100%)。另一方面, CEA 对于诊断本地复发是不太可靠的, 敏感性仅约 60% (Moertel, C.G., 等人, Jama 270 (1993) 943-947)。

作为患者方便性、费用和疾病检测的效力之中的权衡, EGTM 组如 ASCO 组 (Anonymous, J. Clin. Oncol. 14 (1996) 2843-2877) 建议在最初的诊断之后至少 3 年每 2-3 个月进行 CEA 测试。在 3 年之后, 测试可以较不经常地进行, 例如, 每 6 个月。然而, 不存在证据支持

这种测试频率。

如本领域技术的以上讨论所显示的，手术后 CRC 患者的跟踪是利用合适的生物化学标记物或合适的标记物组合的最重要的领域。由于标记物组合 OPN 和 CEA 在所研究的 CRC 患者中的高度敏感性，预计的是，单独的或与一种或多种其他标记物组合的这种标记物组合将在 CRC 患者的跟踪、特别是手术后的 CRC 患者中具有很大帮助。包含 OPN 和 CEA 以及任选的一种或多种其他 CRC 标记物的标记物组在 CRC 患者的跟踪方面的使用代表了本发明的进一步优选的实施方式。

本发明公开了，以及因而在优选的实施方式中涉及了分别在 CRC 的诊断领域或在 CRC 的评估中标记物 OPN 和 CEA 的用途。

在又进一步的实施方式中，本发明涉及包含与一种或多种结肠直肠癌标记分子组合的 OPN 和 CEA 的标记物组根据从个体获得的液体样品在结肠直肠癌的评估中的用途。就此来说，“一种或多种”的表述表示 1 到 20 种、优选的 1 到 10 种、优选的 1 到 5 种、更优选的 3 或 4 种。OPN 和 CEA 和一种或多种其他标记物形成了 CRC 标记物组。

这样，本发明的优选的实施方式是与一种或多种结肠直肠癌标记分子组合的 OPN 和 CEA 的标记物组合根据从个体获得的液体样品在结肠直肠癌的评估中的用途。OPN 和 CEA 测量可以与之组合的优先选择的其他 CRC 标记物是 NSE、ASC、NNMT、CA19-9、MASP、CYFRA 21-1、FREE 和/或 CA 72-4。再进一步优选的，在 CRC 的评估中使用的标记物组包含 OPN 和 CEA 以及选自 NSE 和 NNMT 的至少一种其他的标记分子。

以下更详细地分别讨论了与 OPN 和 CEA 组合的、或形成包含 OPN 和 CEA 的 CRC 标记物组的部分的优选的一种或多种其他标记物。

NSE:

NSE（神经元特异性烯醇酶）也称为糖酵解酶烯醇酶（2-磷酸-D-甘油酸水解酶，EC 4.2.1.11，分子量大约 80 kD）以各种二聚同种型存在，包含称为 α 、 β 和 γ 的三种免疫学上不同的亚单位。烯醇酶的 α -亚单位在哺乳动物中以很多类型存在，而 β -亚单位主要在心脏和横纹肌组织中存在。烯醇酶同种型 $\alpha\gamma$ 和 $\gamma\gamma$ ，其被称为神经元特异性烯醇酶（NSE）或 γ -烯醇酶，主要在神经元和神经内分泌细胞中以及在从它们

发源的肿瘤中以高浓度可检测。(Lamerz R., NSE (Neuronen-spezifische Enolase), γ -Enolase, In: Clinical Laboratory Diagnosis, Thomas, L. (ed.), TH-Books, Frankfurt, 1st English edition (1998), pp. 979-981, 5. deutsche Auflage (1998) pp. 1000-1003)。

NSE 被描述为监视小细胞支气管肺癌 (Lamerz, R., NSE (Neuronen-spezifische Enolase), γ -Enolase, 上文) 的首选标记物, 而对于非小细胞支气管肺癌 CYFRA 21-1 优于 NSE (Ebert, W., 等人, Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 32 (1994) 189-199)。

60-81%的小细胞支气管肺癌情况中发现提高的 NSE 浓度。

对于 NSE, 对于转移的部位或对于脑部转移没有相关性, 蛋儿对于临床阶段, 即疾病的程度有很好的相关性。

响应于化疗, 作为肿瘤细胞的细胞溶解的结果, 在第一次治疗周期后 24-72 小时 NSE 水平上有短暂提高。在一周之内或到第一次治疗周期结束时这跟随这血清值的快速降低 (其在治疗之前是提高的)。相反, 对于治疗的非应答者显示了恒定地提高的或未能降低到参考范围的水平。在症状缓解期间, 80-96%的患者具有正常值。提高的 NSE 值在复发的情况下发现。在某些情况下升高以 1-4 个月的潜伏期发生, 通常是指数性的 (10-94 天的倍增时间) 并与存活时期相关。NSE 在小细胞支气管肺癌疾病的治疗和过程的监视期间作为单一的预后因子和活性标记物是有用的: 诊断敏感性 93%、阳性预测价值 92% (Lamerz, R., NSE (Neuronen-spezifische Enolase), γ -Enolase, 上文)。

在成神经细胞瘤中, 30 ng/ml 以上的 NSE 血清值在 62%的患病儿童中发现。中值根据疾病的阶段提高。在病理性 NSE 值的数量或频率以及疾病的阶段之间存在显著的相关性; 与无疾病存活存在着负相关性。

患有精原细胞瘤的 68-73%的患者具有临床上显著的 NSE 提高 ((Lamerz, R., NSE (Neuronen-spezifische Enolase), γ -Enolase, 上文)。存在着与疾病的临床进程之间的可利用的相关性。

NSE 还在其他肿瘤中测量到: 非肺部恶性疾病在 22%的病例中显示了超过 25 ng/ml 的值 (所有阶段的癌症中)。脑肿瘤例如胶质瘤、脑膜瘤、纤维神经瘤和神经鞘瘤仅仅是偶尔地伴随有提高的血清 NSE 值。在原发脑肿瘤或脑转移中和在恶性黑色素瘤和嗜铬细胞瘤中, 提高的

NSE 值可能在 CSF (脑脊液) 中发生。对于 14% 的器官限制的和 46% 的转移性肾脏癌症中报告了提高的 NSE 浓度, 具有作为独立的预后因子级别的相关性。

在良性疾病中, 提高的血清 NSE 浓度 (> 12 ng/ml) 已经在患有良性肺部疾病和脑部疾病的患者中发现。主要在体液中提高的值以及在脑血管脑膜炎、散布脑炎、脊髓小脑退化、大脑局部缺血、脑梗死、脑内血肿、蛛网膜下出血、头部损伤、炎症性的脑疾病、器质性癫痫、精神分裂症和 Jakob-Creutzfeld 病中发现 (Lamerz, R., NSE (Neuronen-spezifische Enolase), γ -Enolase, 上文)。

可以根据厂家的说明书使用 Roche 产品号码 12133113 在 Elecsys® 分析仪上测量的 NSE。

NNMT:

蛋白质烟酰胺 N-甲基转移酶 (NNMT; Swiss-PROT: P40261) 具有 29.6 kDa 的表观分子量和 5.56 的等电点。

NNMT 催化烟酰胺和其他吡啶的 N-甲基化。这种活性对于许多药物和生物体内异物化合物的生物转化是重要的。该蛋白质已经被报道主要在肝脏中表达并位于细胞质中。NNMT 已经从来自人类肝脏的 cDNA 中克隆, 并含有编码具有 29.6 kDa 计算的分子量的 264 氨基酸蛋白质的 792 核苷酸开放阅读框 (Aksoy, S., 等人, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 14835-14840)。关于这个酶在人类癌症中的潜在作用在文献中知道的很少。在一篇论文中, 提高的肝脏 NNMT 酶活性被报道作为小鼠中癌症恶病体质的标记物 (Okamura, A., 等人, *Jpn. J. Cancer Res.* 89 (1998) 649-656)。在新近的报道中, 展现了 NNMT 基因在放射敏感性细胞系中相应于放射的减量调节 (Kassem, H., 等人, *Int. J. Cancer* 101 (2002) 454-460)。

近来发现 (WO 2004/057336) 的是, NNMT 在 CRC 的评估中是感兴趣的。在 WO 2004/057336 中描述的免疫分析已经被用于测量当前研究的样品 (CRC, 健康对照和非恶性结肠疾病)。

CA 19-9:

测量的 CA19-9 (碳水化合物抗原 19-9) 值通过使用单克隆抗体

1116-NS-19-9 来定义。血清中的 1116-NS-19-9 反应性决定簇主要在含有高数量的 CA19-9 表位的粘蛋白样蛋白质上表达 (Magnani, J.L., Arch. Biochem. Biophys. 426 (2004) 122-131)。

3-7%的群体具有 Lewis a-阴性/b-阴性血型结构, 并且不能表达具有反应性决定簇 CA 19-9 的粘蛋白。当解释发现时必需考虑这一点。

含有 CA19-9 的粘蛋白在胎儿胃、肠和胰腺上皮细胞中表达。在成年人组织中在肝脏、肺和胰腺中也可以发现低的浓度 (Fateh-Moghadam, A., 等人, 上文; Herlyn, M., 等人, J. Clin. Immunol. 2 (1982) 135-140)。

CA 19-9 分析值可以帮助患有胰腺癌的患者的区分诊断和监视 (敏感性 70-78%) (Ritts, R.E., Jr., 等人, Int. J. Cancer 33(1984) 339-345)。在肿瘤质量和 CA 19-9 分析值之间没有相关性。然而, 具有高于 10,000 U/mL 的 CA 19-9 血清水平的患者几乎总是具有远端转移。

CA 19-9 的测定不能用于胰腺癌的早期检测 (Steinberg, W.M., 等人, Gastroenterology 90 (1986) 343-349)。

在肝胆癌中, CA 19-9 值提供了 50-75%的敏感性。在胃癌的情况下建议了 CA 72-3 和 CEA 的伴随性测定。在结肠直肠癌中, 单独的 CEA 测定是足够的; 仅在有限数量的 CEA 阴性病例中, CA 19-9 可能是有用的。

由于粘蛋白由肝脏专门地分泌, 在某些情况下甚至轻微的胆汁郁积可以引起明显提高的 CA 19-9 血清水平。还在胃肠道和肝脏的许多良性和炎症性疾病中以及在囊性纤维化中发现提高的 CA 19-9 值。

已经根据厂家的说明书使用 Roche 产品号码 11776193 在 Elecsys® 分析仪上测量的 CA 19-9。

ASC:

“含有半胱氨酸蛋白酶相关的募集结构域的细胞凋亡相关斑点样蛋白质” (ASC) 也被称为“甲基化诱导的沉默的目标 1” (TMS1) (Swiss-PROT: Q9ULZ3)。ASC 具有 21,627 Da 的理论分子量和 pH 6.29 的理论等电点。

半胱氨酸蛋白酶相关募集结构域 (CARDS) 介导接头蛋白质例如 APAF1 (细胞凋亡蛋白酶活化因子 1) 和参与细胞凋亡的半胱氨酸蛋白

酶的前体形式（例如，CASP 9）之间的相互作用。ASC 是含 CARD 接头蛋白质家族的成员。

通过免疫筛选早幼粒细胞系，Masumoto 等人分离了编码 ASC 的 cDNA。推断的 195 氨基酸蛋白质含有 N-末端 pyrin 样结构域 (PYD) 和 87 残基 C-末端 CARD。Western 印迹分析显示了 22 kDa 蛋白质的表达，并且表明了 ASC 可能通过提高白血病细胞系对抗癌药的细胞凋亡刺激的易感性来具有促细胞凋亡活性 (Masumoto, J., 等人, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 33835-33838)。

Conway 等人的甲基化敏感限制 PCR 和甲基化特异性 PCR (MSP) 分析表明，ASC 的沉默与围绕外显子 1 的 CpG 岛的超甲基化相关，DNMT1 (DNA 胞嘧啶-5-甲基转移酶-1) 的过量表达促进了超甲基化和 ASC 的沉默。乳腺癌细胞系，而不是正常的乳腺组织，展现了 ASC 的完全甲基化，并且不表达 ASC 信息。在乳腺癌细胞系中 ASC 的表达抑制生长并降低幸存克隆的数量。Conway 等人断定，ASC 功能在于促进半胱氨酸蛋白酶依赖性细胞凋亡，以及 ASC 的过量表达抑制乳腺癌细胞的生长 (Conway, K.E., 等人, *Cancer Research* 60(2000) 6236-6242)。

McConnell 和 Vertino 显示了，ASC 的可诱导表达抑制了细胞增殖，并诱导了可以被半胱氨酸蛋白酶抑制物阻断的 DNA 段裂。免疫荧光显微术表现了，细胞凋亡的诱导引起了从弥散的细胞质表达向球形核周聚集物的 CARD 依赖性转移 (McConnell, B.B., and Vertino, P.M., *Cancer Research* 60 (2000) 6243-6247)。Moriani 等人观察到 ASC 基因的甲基化不仅在乳腺癌细胞中，而且在胃癌中。他们提出在涉及促细胞凋亡 ASC 基因的减量调节的乳腺癌和胃癌的进展中 ASC 基因的正常甲基化的指导作用 (Moriani, R., 等人, *Anticancer Research* 22(2002) 4163-4168)。

Conway 等人检查了原始乳腺组织的 TMS1 甲基化，并将结果与健康组织中的甲基化相比较 (Conway K.E., 等人, *Cancer Research* 60 (2000) 6236-6242)。Levine 等人发现，ASC 沉默不与特定 CpG 位点的甲基化相关，而是与 ASC CpG 岛的密集甲基化相关联。含有专门地甲基化的 ASC 拷贝的乳腺肿瘤细胞系不表达 ASC，而在部分甲基化的细胞系中，ASC 表达的水平与细胞群体中存在的甲基化的 ASC 等位基因的百分比直接相关 (Levine, J.J., 等人, *Oncogene* 22 (2003))

3475-3488)。

Virmani 等人检查了肺癌和乳腺癌组织中的 ASC 的甲基化状态。他们发现, ASC 的异常甲基化在 46%的乳腺癌细胞系和 32%的乳腺肿瘤组织中存在。甲基化在非恶性乳腺组织中是稀有的(7%)(Virmani, A., 等人, *Int. J. Cancer* 106 (2003) 198-204)。

Shiohara 等人发现, ASC 的增量调节与人类嗜中性细胞中的炎症和细胞凋亡紧密相关(Shiohara, M., 等人, *Blood* 98 (2001) 229a)。

Masumoto 等人观察到, 高水平的 ASC 在上皮细胞和白细胞中丰富地表达(Masumoto, J., 等人, *Journal Histochem. Cytochem.* 49(2001) 1269-1275)。

已经为 ASC 的测量开发了自有的夹心免疫分析。这种分析以微量滴定板形式进行。使用链霉抗生物素蛋白包被的微量滴定板。针对 ASC 的生物素化的多克隆抗体用作捕获抗体, 针对 ASC 的地高辛化的多克隆抗体被用作这个夹心分析中的第二特异性结合配偶体。形成的夹心复合物最终通过抗毛地黄毒苷辣根过氧化酶轭合物和合适的过氧化物酶底物来显现。

MASP:

蛋白质 MASP (maspin 前体; Swiss-PROT: P36952) 是 42kDa 蛋白质, 其与蛋白酶抑制物的丝氨酸蛋白酶抑制蛋白 (serpin) 超家族具有同源性。免疫染色研究展现了, maspin 在细胞外基质中和在质膜上存在(Zou, Z., 等人, *Science* 263 (1994) 526-529)。

人类 MASP 基因 (PI5 的 SERPINB5) 最初通过减法杂交在它的 mRNA 水平表达的基础上分离自正常乳腺的上皮细胞(Zou 等人, 上文)。Maspin 在正常的乳腺上皮细胞中表达, 但在大多数乳腺癌细胞系中不表达。Zou 等人(上文)显示了它的表达降低了转化的细胞诱导肿瘤形成和转移的能力, 表明 maspin 基因编码肿瘤抑制物。

Bass, R. 等人 (*J. Biol. Chem.* 277 (2002) 46845-46848) 表征了真核的 maspin 并发现它对于所测试的任何蛋白水解系统没有蛋白酶抑制效果。然而, 它确实抑制肿瘤和血管平滑肌细胞的迁移。

Song, S.Y. 等人 (*Digestive Diseases and Sciences* 47 (2002) 1831-1835) 通过来自腺瘤、腺癌和转移性腺癌的组织切片的免疫组织

化学染色研究了 maspin 在结肠癌中的表达。Song 等人 (上文) 发现的 maspin 的免疫反应性是细胞质的, 具有某些核染色。超过 90% 的腺瘤、75% 的腺癌和 47% 的转移癌组织切片对于 maspin 是染色阳性。这项研究具有的局限性是没有使用定量分析系统, 例如 Western 印迹分析。没有评估与邻近的正常结肠组织相比的表达水平。

FERR:

铁蛋白 (FERR) 是含有约 20% 的铁的蛋白质, 在肠、肝脏和脾中发现。它是铁在体内保存的主要形式之一。身体铁保存已经被报道提高结肠直肠癌发生的风险。在 Scholefield, J.H. 等人 (Dis. Colon Rectum 41 (1998) 1029-1032) 使用来自 148 位患者 (50 位患者具有证明的结肠直肠癌, 49 位患者没有结肠疾病, 患者具有结肠的腺瘤) 的研究中, 分析的血清铁蛋白。在三个组的任何之中在血清铁蛋白水平方面没有显著差异。

CYFRA 21-1:

“CYFRA 21-1” 的分析特异性地测量在循环中存在的 cytokeratin 19 的可溶性片段。CYFRA 21-1 的测量一般基于两种单克隆抗体 (Bodenmueller, H., 等人, Int. J. Biol. Markers 9 (1994) 75-81)。在来自 Roche Diagnostics, Germany 的 CYFRA 21-1 分析中, 使用了两种特异性单克隆抗体 (KS 19.1 和 BM 19.21), 测量具有约 30,000 道尔顿分子量的 cytokeratin 19 的可溶性片段。

Cytokeratins 是形成上皮中间细丝的亚单位的结构蛋白质。迄今为止鉴定了二十种不同的 cytokeratin 多肽。由于它们的特定分布模式, 它们特别适用于作为肿瘤病理中的区分标记物。完整的 cytokeratin 多肽是难溶的, 但是可以在血清中检出可溶的片段 (Bodenmueller, H., 等人, 上文)。

CYFRA 21-1 是非小细胞肺癌 (NSCLC) 的公认的标记物。CYFRA 21-1 的主要适应症是监视非小细胞肺癌 (NSCLC) 的进程 (Sturgeon, C., Clinical Chemistry 48 (2002) 1151-1159)。

在初步诊断中, 在患有非小细胞肺癌的患者中, 高 CYFRA 21-1 血清水平表明高级的肿瘤阶段和不良预后 (van der Gaast, A., 等人,

Br. J. Cancer 69 (1994) 525-528), 等人 正常的或仅仅轻微提高的值不能排除肿瘤的存在。

CYFRA 21-1 血清水平向正常范围的快速下降记录了成功的治疗。稳定的 CYFRA 21-1 值或在 CYFRA 21-1 值方面轻微的或仅缓慢的降低表明肿瘤的不完全消除, 或具有相应的治疗和预后结论的多个肿瘤的存在。疾病的进展通常由提高的 CYFRA 21-1 值相比临床症状和成像操作更早地显示。

公认的是, 肺癌的初步诊断结论应当在临床症状、成像或内窥镜操作和手术中发现的基础上进行。肺部内不清晰的圆形病灶与 CYFRA 21-1 值 > 30 ng/mL 一起表明存在原发性支气管肺癌的高可能性。

CYFRA 21-1 也适合于膀胱的肌浸性癌症的进程监视。对于良性的肺部疾病 (肺炎、结节病、肺结核、慢性支气管炎、支气管哮喘、肺气肿) CYFRA 21-1 显示了良好的特异性。

轻微提高的值 (直至 10 ng/mL) 很少在显著的良性肝脏疾病和肾衰竭中发现。与性别、年龄或吸烟没有相关性。CYFRA 21-1 的值还不受妊娠的影响。

近来, 已经发现 CYFRA 还在乳腺癌领域中检测疾病复发和评估治疗效力方面有用。(Nakata, B., 等人, British J. of Cancer (2004) 1-6)。

优选的, 已经根据厂家的说明书使用 Roche 产品号码 11820966 在 Elecsys® 分析仪上测量的 CYFRA 21-1。

本领域技术人员将理解, 存在着许多方法来使用两种或多种标记物的测量值以改善在研究中的诊断问题。在十分简单的、但尽管如此常常有效的方法中, 如果样品对于研究的至少一种标记物是阳性的, 假定阳性结果。例如, 当诊断传染性疾病如 AIDS 时, 这是一种情况。

然而, 经常地, 评估标记物的组合。优选的, 对标记物组的标记物测量的单独的值被组合, 组合值与基础的诊断问题相关联。在本发明中, 标记物 OPN 和 CEA 的组合被用于 CRC 的评估。

可以通过任何适合的本领域的数学方法组合标记物值。将标记物组合与疾病相关联的公知的数学方法采用了一些方法, 如, 辨别分析 (DA) (即, 线性的、二次的、调整的 DA)、Kernel 方法 (即, SVM)、非参数方法 (即, k-最近邻分类者)、PLS (部分最小二乘方)、基于树的方法 (即, 逻辑回归, CART, 随机森林法, Boosting/Bagging 方法)、

一般化的线性模型(即,逻辑回归)、基于主分量的方法(即, SIMCA)、一般化的加法模型、基于模糊逻辑的方法、神经网络和基于遗传算法的方法。熟练的技术人员在选择合适的方法来评估本发明的标记物组合方面将没有困难。优选的,在将本发明的标记物组合与例如 CRC 的不存在或存在相关联中使用的方法选自 DA(即,线性的、二次的、调整的 DA)、Kernel 方法(即, SVM)、非参数方法(即, k-最近邻分类者)、PLS(部分最小二乘方)、基于树的方法(即,逻辑回归, CART, 随机森林法, Boosting/Bagging 方法)或一般化的线性模型(即,逻辑回归)。关于这些统计方法的细节在以下参考文献中找到: Ruczinski, I., et al, *J. of Computational and Graphical Statistics*, 12(2003) 475-511; Friedman, J. H., *J. of the American Statistical Association* 84(1989) 165-175; Hastie, T., 等人, *The Elements of Statistical Learning*, Springer Series in Statistics(2001); Breiman, L., 等人, *Classification and regression trees*, California, Wadsworth(1984); Breiman, L., *Random Forests*, *Machine Learning* 45(2001) 5-32; Pepe, M.S., *The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction*, Oxford Statistical Science Series, 28(2003); 和 Duda, R.O., 等人, *Pattern Classification*, Wiley Interscience, 2nd edition(2001)。

本发明的优选的实施方式是使用关于生物标志物的基础组合的优化的多元筛截,和辨别状态 A 与状态 B,例如患病与健康。在这种类型的分析中,标记物不再是独立的,而是形成标记物组。可以确立的是,OPN 的测量与 CEA 的测量显著地改善了与任一单独标记物相比的 CRC 的诊断精确性。

显著地,在约 90%的稳定和预设的特异性下,标记物组合 OPN 和 CEA 用于诊断 CRC 的敏感性已经被发现与每个单独的标记物相比显著地提高。

通过诊断方法的接受者操作特征(ROC)最好地描述了诊断方法的精确性(特别参见 Zweig, M. H., and Campbell, G., *Clin. Chem.* 39(1993) 561-577)。ROC 图表是在所观察数据的整个范围上连续改变判定阈值产生的所有的敏感性/特异性配对的标绘图。

实验室测试的临床性能取决于它的诊断精确性,或正确地将受试者分类到临床上相关的亚群中的能力。诊断精确性衡量了所述测试正

确地区分被研究受试者的两种不同状况的能力。这些状况例如健康和患病，或者良性和恶性疾病。

在每种情况下，通过在判定阈值的完整范围上标绘出敏感性对比1-特异性，ROC标绘图描绘了两种分布之间的重叠。在Y轴上是敏感性，或者真阳性部分[定义为(真阳性测试结果的数量)/(真阳性的数量+假阴性测试结果的数量)]这也被称作存在疾病或状况的确实性。它单独地从受影响的亚群中计算。在X轴上是假阳性部分，或1-特异性[定义为(假阳性结果的数量)/(真阴性的数量+假阳性结果的数量)]。它是特异性的指数，完全从未受影响的亚群中计算。因为使用来自两个不同亚群的测试结果完全独立地计算真阳性和假阳性部分，ROC标绘图独立于样品中的疾病发病率。在ROC标绘图上的每个点代表了相应于特定的判断阈值的敏感性/1-特异性配对。具有理想辨别力(在结果的两个分布中没有重叠)的测试具有穿过左上角的ROC标绘线，其中真阳性部分是1.0，或100%(理想的敏感性)、假阳性部分是0(理想的特异性)。没有辨别力的测试的理论标绘图(两个组的结果相同的分布)是从左下角到右上角的45°对角线。大多数标绘图落入这两个极端之间。(如果ROC标绘图完整落在45°对角线之下，通过将"阳性"的指标从"大于"转变成"低于"来容易地补救，反之亦然。)定性地，标绘图约靠近左上角，试验的总体精确度越高。

测定实验室测试的诊断精确性的一个方便的目标是通过单个数字表示它的性能。例如，这种总体参数是所谓的“总误差”或作为选择“曲线下面积=AUC”。最常见的全局度量是ROC标绘图下的面积。按照惯例，这个面积永远 > 0.5 (如果不是，人们可以反转判断规则使它这样)。值在1.0(两个组的测试值的理想分离)和0.5(在测试值的两个组之间没有明显的分布差异)之间。该面积不仅取决于标绘图的特定部分，例如靠近对角线的点或在90%特异性下的敏感性，还取决于整个标绘图。这是ROC标绘图多么接近理想标绘图(面积=1.0)的定量的、描述性的表述。

两种标记物OPN和CEA的组合显著地改善了CRC的诊断精确性，如提高的曲线下面积所展现的。

OPN和CEA与近来发现的CRC标记物如ASC或NNMT、或与已知的肿瘤标记物如CYFRA 21-1和NSE、或其他尚待发现的CRC标

记物的组合测量，分别地引起或将引起 CRC 评估中的进一步改进。

在优选的实施方式中，本发明涉及改善相对于健康对照和患有非恶性结肠疾病的患者的 CRC 诊断精确度的方法，通过分别测量样品中至少 OPN 和 CEA 的浓度，并且将所测定的值算术地组合并将所测定的浓度与 CRC 的存在或不存在相关联，与基于任一单独的标记物的分类法相比，所述改善使得更多的患者被正确地分类为患有 CRC 或者健康对照和患有非恶性结肠疾病的患者。

在根据本发明的进一步优选的方法中，分别测定至少生物标记物 OPN、CEA 和 NSE 的浓度，标记物组合用于 CRC 的评估。

在根据本发明的进一步优选的方法中，分别测定至少生物标记物 OPN、CEA 和 NNMT 的浓度，标记物组合用于 CRC 的评估。

提供以下的实施例和附图来帮助理解本发明，它们的真实范围在附随的权利要求中阐述。要理解的是，可以在所列的步骤中进行修改而不背离本发明的精神。

实施例 1:

研究群体

研究群体在表 1 中给出。

表 1: 研究群体: CRC 样品和相应的 UICC 分类

根据 UICC 的阶段	样品数
UICC 0	8
UICC I	41
UICC II	53
UICC III	67
UICC I-III (未分类的, 非 IV 阶段)	13
UICC IV	61
没有分阶段	11
CRC 样品的总数	254

研究群体包括来自用 CRC 诊断的 254 位患者 (参见表 1) 的血清

样品和 391 份对照样本。这两个组都被分为训练集和测试集。

分析基于 128 份 CRC 样品和 195 份对照样本的训练集。对于对照，16 份来自没有任何胃肠疾病的个体，50 份来自患有痔的个体，5 份来自患有其他肠疾病的患者；63 份对照来自患有肠憩室的个体，61 份来自健康献血者。

测试集由 126 份 CRC 样品和 196 份对照组成。对于对照，20 份来自没有任何胃肠疾病的个体，43 份来自患有痔的个体，8 份来自患有其他肠疾病的患者；65 份对照来自患有肠憩室的个体，60 份来自健康献血者。

实施例 2:

使用的分析过程

使用商业上可获得的试剂盒（分别为 Roche Diagnostics 产品号码 11731629、11820966 和 12133113）分析标记物 CEA、CYFRA 21-1 和 NSE。

在 WO 2004/057336 中描述的免疫分析已经用于测量当前研究的样品中的 NNMT。简言之，多余人类血清或血浆中的 NNMT 检测，开发了夹心 ELISA。为了抗原的检测和捕获，等分量的抗 NNMT 多克隆抗体与生物素和毛地黄毒苷分别结合。

在 10 mM 磷酸盐、pH 7.4、1%BSA、0.9% NaCl 和 0.1%吐温 20 中，链霉抗生物素蛋白包被的 96 孔微量滴定板与 100 μ l 生物素化的 10 μ g/ml 抗 NNMT 多克隆抗体孵育 60 分钟。在孵育之后，用 0.9% NaCl、0.1%吐温 20 洗涤平板三次。然后用重组蛋白质的连续稀释物作为标准抗原或用来自患者的稀释的血浆样品孵育反应孔 2h。在 NNMT 的结合之后，用 0.9% NaCl、0.1%吐温 20 洗涤平板三次。对于结合 NNMT 的特异性检测，用 100 μ l 地高辛化的抗 NNMT 多克隆抗体以 10 μ g/ml 在 10 mM 磷酸盐、pH 7.4、1% BSA、0.9% NaCl 和 0.1%吐温 20 中孵育 60 分钟。此后，洗涤平板三次来除去未结合的抗体。在接下来的步骤中，反应孔在 10 mM 磷酸盐、pH 7.4、1% BSA、0.9% NaCl 和 0.1%吐温 20 中与 20 mU/ml 抗毛地黄毒苷 POD 轭合物（Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, 目录号 1633716）孵育 60 分钟。随后用相同的缓冲液洗涤平板三次。对于抗原抗体复合物的检

测,反应孔与 100 μ l ABT 溶液 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany, 目录号 11685767) 孵育,在 30-60 分钟后用 ELISA 读取器在 405 nm 测量 OD。

在自有的夹心 ELISA 中测量 OPN。对于抗原的捕获和检测,使用两种不同的抗体。选择这些抗体以具有非重叠的表位。使用的两个抗体的表位在骨桥蛋白序列的氨基酸 167 和羧基末端之间 (Kiefer M.C., 等人, Nucl. Acids Res. 17 (1989) 3306)。

一种抗体被生物素化,用作捕获抗体。第二抗体被地高辛化。然后通过使用合适的抗 DIG 二级抗体检测地高辛化的抗体。

分析过程基本上如同以上对于 NNMT 的检测而不是对于 OPN 特异性抗体所描述的。

实施例 3:

产生的数据的数学评估

分类算法用调整的辨别分析 (RDA) 产生,其是常见的辨别分析的全面化,即,二次-和线性辨别分析 (McLachlan, G. J., Discriminant Analysis and Statistical Pattern Recognition, Wiley Series in probability and mathematical statistics, 1992)。在 RDA 中,使用了对于协方差矩阵的普通的最大似然率 (插入) 估计的替代。这些替代的特征在于两个参数 (λ , γ), 它们的值通过共同地最小化将来的错分类风险的基于样品的估计来定制到单独的位置 (Friedman, J. H., Regularized Discriminant Analysis, J. of the American Statistical Association 84(1989) 165-175)。作为替代性方法,支撑矢量机算法 (Hastie, T., 等人, The Elements of Statistical Learning, Springer Series in Statistics, 2001) 可以提供可比较的分类结果。

从对于分类问题最好的单一标记物开始逐步地构建标记物组,当在约 90% 的特异性水平下敏感性的提高不再显著地改变时结束。为了获得集中的分布,用天然的对数函数转化每个单独的标记物。使用 5 倍交叉验证。

表 2 呈现了诊断患有 CRC 的患者对比包括非恶性结肠疾病的对照的分类结果。

表 2: 患有 CRC 的患者对比健康对照和疾病对照的分类结果

标记物的编号	标记物或标记物组	方法 (RDA)	截止值	交叉验证 (5倍/训练集)		测试集的分类	
				敏感性	特异性	真阳性 (敏感性)	真阴性 (特异性)
1	log_CEA	$\lambda = 0.5, \gamma = 0$	0.6	38.2%	91.2%	41.3%	91.8%
1	log_OPN_T	$\lambda = 0.5, \gamma = 0$	-0.4	34.1%	90.9%	30.2%	92.3%
2	log_OPN_T log_CEA	$\lambda = 1, \gamma = 0$	0.3	45.6%	90.2%	48.4%	91.3%
3	log_OPN_T log_CEA log_NNMT	$\lambda = 1, \gamma = 0$	0.2	47.2%	90.8%	46.8%	90.8%
3	log_OPN_T log_CEA log_NSE	$\lambda = 0.75, \gamma = 0$	0	47.1%	90.9%	50%	92.3%

如通过 RDA 测定的, 在以上研究群体中 OPN 的敏感性是大约 34%, 而对于 CEA 发现了约 38% 的敏感性。具有单独的 OPN 和 CEA 的标记物组发现展现了敏感性到约 46% 的显著提高。从表 2 可以看出, 用训练集确定的数据在样品的测试集中基本上被确认了。